

10/528444

Rec'd PCT 18 MAR 2005

PCT/CN03/00748

# 证 明

REC'D 07 OCT 2003

WIPO

PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 09 18

申 请 号： 02 1 30686.9

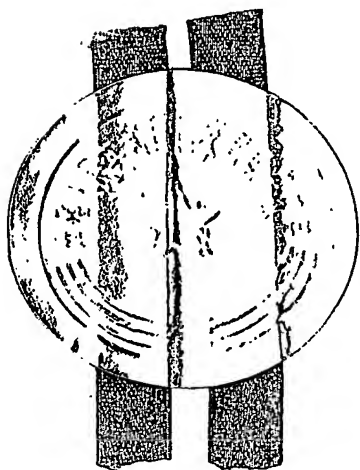
申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 高免疫抑制活性的水溶性雷公藤内酯醇衍生物及其应用

申 请 人： 成都达远药物有限公司； W & K 国际公司

发明人或设计人：王大元；谭鸿；孔焱

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



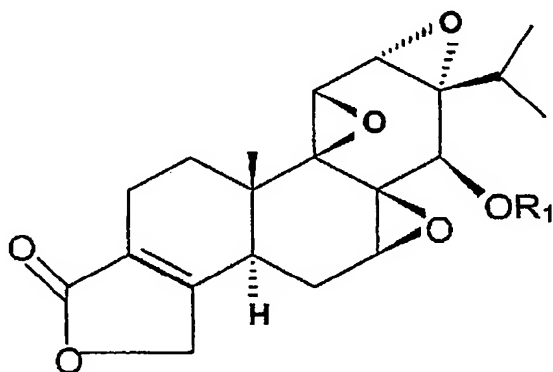
中华人民共和国  
国家知识产权局局长

王 景 川

2003 年 9 月 15 日

# 权利要求书

1. 一种雷公藤内酯醇衍生物，其结构式为：

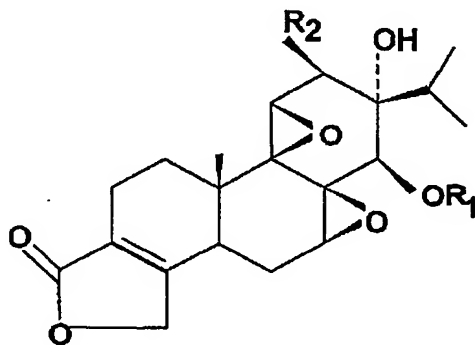


结构式 I

其中  $R_1$  是 H，或磷酸酯 ( $-\text{P}(\text{O})(\text{Ox}_1)(\text{Ox}_2)$ ) 或亚磷酸酯 ( $-\text{P}(\text{H})(\text{Ox}_1)(\text{Ox}_2)$ )， $X_1$  和  $X_2$  是 Na，或 K，或  $\text{NH}_4$ 。

2. 制备权利要求 1 所述的化合物的方法，包括将先导化合物雷公藤内酯醇与三氯氧磷，三氯化磷，或其它磷酯酰卤、磷酸酯、亚磷酯酰卤、亚磷酸酯等化合物反应的步骤。

3. 一种雷公藤内酯醇衍生物，其结构式为：

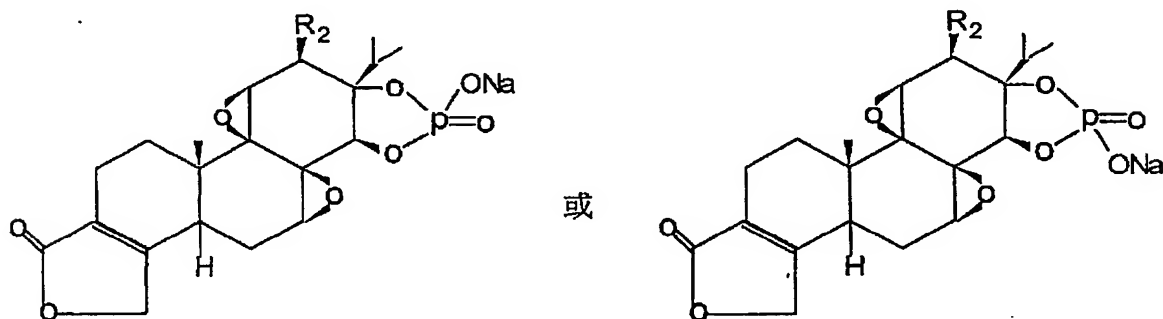


结构式 II

其中  $R_1$  是 H, 或含有 1—4 个碳原子的烷基, 或  $-C(=O)(CH_2)_nCO_2$ ,  
 其中,  $n$  为 1—4 的整数, 或磷酸酯(  $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{P}-\overset{\overset{OX_1}{\mid}}{\underset{\underset{OX_2}{\mid}}{}}{}$  ), 或亚磷酸酯(  $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{P}-\overset{\overset{OX_1}{\mid}}{\underset{\underset{H}{\mid}}{}}{}$  ),  
 $X_1$  和  $X_2$  是 Na, 或 K, 或  $NH_4$ ,  $R_2$  是 H, 或 -SCN 或 -Cl, 或 -Br。

4. 制备权利要求 3 所述的化合物的方法, 包括将第二种先导化合物  
 12- $\beta$ -硫氰酸基-13- $\alpha$ -羟基雷公藤内酯醇酯化和磷酸酯化的步骤。

5. 一种雷公藤内酯醇衍生物, 其结构式为:



结构式 IIIa

结构式 IIIb

其中  $R_2$  是 H, 或 -SCN, 或 -Cl, 或 -Br。

6. 制备权利要求 5 所述的化合物的方法, 包括将第二种先导化合物  
 12- $\beta$ -硫氰酸基-13- $\alpha$ -羟基雷公藤内酯醇与三氯氧磷或其它磷酸酯酰卤、磷酸  
 酯, 亚磷酸酯等化合物反应, 或者将第一种先导化合物雷公藤内酯醇与三氯  
 氧磷或其它磷酸酯酰卤、亚磷酸酯酰卤等化合物反应的步骤。

7. 权利要求 1, 3, 和 5 中任一项的化合物在制备作为免疫抑制剂或  
 者抗炎剂的药物中的用途。

8. 根据权利要求 7 的用途, 其中所述的免疫抑制剂或者抗炎剂用于治  
 疗那些与淋巴 T, B 细胞生长, 细胞因子 IL-1, IL-2, IL-6, iNOS 的产  
 生, 以及 Cox-2 的产生有关的疾病。

1020331

9. 根据权利要求 8 的用途，其中所述的疾病是自动免疫缺陷疾病和炎症。

10. 根据权利要求 11 的用途，其中所述的疾病是类风湿性关节炎，哮喘，系统红斑狼疮，牛皮癣，多重硬皮症，动脉粥样硬化，I-型糖尿病，  
5 肾炎。

## 5 高免疫抑制活性的水溶性雷公藤内酯醇衍生物及其应用

## 技术领域

10 本发明涉及药物化学领域，更具体地，本发明涉及具有高免疫抑制活性的水溶性雷公藤内酯醇(triptolide)衍生物，其制备方法和这些衍生物在治疗与免疫抑制有关的疾病中的用途。

## 背景技术

15 免疫抑制因子被广泛应用于治疗类风湿性关节炎，哮喘，系统红斑狼疮(SLE)，牛皮癣，多重硬皮症，动脉粥样硬化，肾炎，I-型糖尿病等自动免疫缺陷疾病和与免疫相关的炎症。免疫抑制因子也是目前解决器官移植后异体排斥的最有效治疗手段。最常用的免疫抑制因子有硝基咪唑硫嘌呤(azathyopurine)，皮质甾酮(corticosteroids)，氨甲喋呤(methotrexate)，环  
20 磷酰胺(cyclophosphamide)，6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)，长春新碱(vincristine)，西乐葆(celebrox)，环孢菌素A(cyclosporine A)，FK506等。但是这些药物并非都是完全有效，大多数都伴有较高毒性。

免疫抑制的活性与免疫系统的T，B细胞密切相关。T，B细胞分泌产生多种细胞因子。每种细胞因子都有其特定的生理功能，因而其所反映的医疗领域也不尽相同。简单的检测某种化合物对T，B细胞的抑制程度来判断此化合物的免疫抑制活性的高低是不充分的。相反，对T，B细胞的抑制程度目前  
25 常被用来检测一个化合物细胞毒性。例如，同是免疫抑制因子的环孢菌素A和氨甲喋呤抑制的细胞因子不同，环孢菌素A主要抑制白介II(IL-2)，对白介I(IL-I)抑制作用很弱，其主要临床应用是防止器官移植后异体排斥。而氨甲喋  
30 呤对IL-II的抑制作用较弱，但对IL-I有较强的抑制作用，主要用于与免疫抑制有关的炎症，如类风湿性关节炎。虽然目前已发现的细胞因子多达数十种，大多数的细胞因子的生理功能仍然不清楚，但IL-1，IL-2，IL-6，TNF，iNOS

等细胞因子在免疫调节中的生理功能以及与治疗领域的相关性比较清楚。因此在做动物试验之前能就化合物对这些细胞因子的作用进行研究,对以后的动物试验的目标和实验方案的制定有指导意义。

中国药用植物雷公藤已被证明具有很强的免疫抑制活性。其粗提物(如市  
5 上有售的雷公藤多甙片)已被临床用于治疗类风湿性关节炎,哮喘,系统红  
斑狼疮(SLE),牛皮癣等自动免疫缺陷疾病。用雷公藤中提取的化合物雷公藤内  
酯醇(triptolide)做防止器官移植后异体排斥的研究也表明其活性接近于环孢  
菌素 A。雷公藤植物的显著免疫抑制活性引起国内外相关实验室的注意,并进  
行了多方面的研究。其研究领域涉及以下方面:

10 1. 从雷公藤植物中分离提纯有效的免疫调节化合物。迄今已从雷公藤植  
物中分离得到 100 种以上的化合物。如雷公藤内酯醇(triptolide), 16-羟基雷  
公藤内酯醇, 山海棠素(triptophenolide), 雷公藤乙素(tripdiolide), 雷公藤  
氯内酯醇(tripchorolide)等化合物。其中对雷公藤内酯醇的免疫调节和抗肿瘤  
15 活性研究较多。由于雷公藤内酯醇的免疫抑制活性最高,在植物中的含量相对  
较高,可作结构改造的位点较多,因而得到较广泛的研究。

2. 对有高免疫抑制活性的雷公藤内酯醇作化学结构改造,以降低先导化  
合物雷公藤内酯醇的毒性。围绕这方面的研究工作已有如下专利和文章发表:  
美国专利(US Patent): 6,150,539, 6,004,999, 5,972,998,  
5,962,516, 和 5,663,335; PCT 专利申请:W0 00/12483; 中国专利 CN  
20 1027371C, ZL 专利号 89106941.0。

3. 天然产物雷公藤内酯醇的化学全合成: Yang D 等, 有机化学  
(J. Org. Chem.) 2000 Apr. 7; 65(7):2208-17。

4. 用细胞培养法生产天然产物雷公藤内酯醇: 美国专利: US Patent  
4,328,309。

25 虽然雷公藤内酯醇的免疫抑制活性相当高,但由于如下缺点限制了它的临  
床应用: 1. 毒性高,其  $LD_{50}$  为 0.85mg/kg 体重,并有生殖毒性。2. 水溶解性  
低,无法作静脉(iv)注射。3. 细胞膜通透性(permeability)低(我们未发表实验  
结果),口服效果不好。

围绕这些问题,一些实验室对雷公藤内酯醇的化学结构改造做了一系列工  
30 作。其中 US Patent 5,962,516 中的 14-丁二酸酐雷公藤内酯醇提高了水溶解

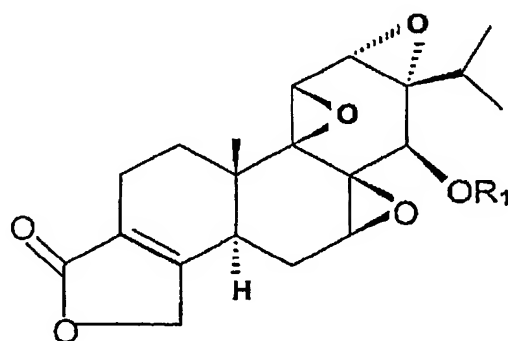
性。US Patent 6,150,539 的 8-羟基雷公藤内酯醇和 PCT 专利申请 WO 00/63212 的 12-巯氢酸基雷公藤内酯醇都在保持原有化合物活性同时，在降低先导化合物雷公藤内酯醇的毒性方面取得成功。其中 12-巯氢酸基雷公藤内酯醇的  $LD_{50}$  为 74mg/kg 体重，其毒性比先导化合物雷公藤内酯醇的  $LD_{50}$  为 0.85mg/kg 体重降低了约 87 倍。但这些从雷公藤内酯醇衍生而来的类似物的水溶性仍然很低，细胞膜通透性也低。

PCT 专利申请 WO02/28862 提供了水溶性雷公藤内酯醇衍生物的一些信息。US Patent 6,150,539 给出了一些水溶性的雷公藤内酯醇衍生物，但没有给出这些水溶性的雷公藤内酯醇衍生物的免疫抑制活性实验数据。目前我们所看到的已发表的资料中具有水溶性好，又有高免疫抑制活性的水溶性的雷公藤内酯醇衍生物仍以 US Patent 5,962,516 中的 14-丁二酸酐雷公藤内酯醇为好，其在抗肿瘤和器官移植中的应用见诸于美国专利 (US Patent United States Patent) 6,329,148 和移植 (Transplantation) 2000 Nov 27;70(10):1442-7。

## 15 发明概述

本发明的第一个方面是提供了三类具有水溶性和免疫抑制活性的新型雷公藤内酯醇衍生物化学结构：

第 I 类雷公藤内酯醇衍生物是：

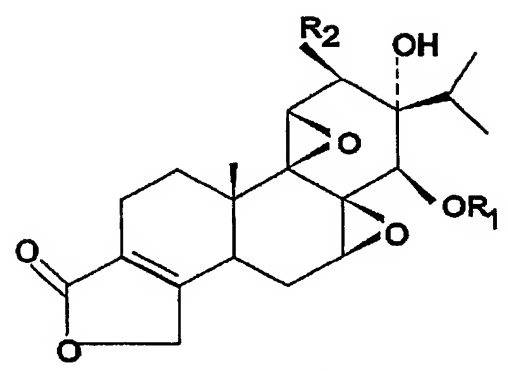


结构式 I

其中  $R_1$  是 H，磷酸酯 ( $-\text{P}(\text{O})(\text{O}X_1)(\text{O}X_2)$ ) 或亚磷酸酯 ( $-\text{P}(\text{O})(\text{O}X_1)_2$ )。在本发明的第 I 类化合物中，优选  $R_1$  是磷酸酯 ( $-\text{P}(\text{O})(\text{O}X_1)(\text{O}X_2)$ )， $X_1$  和  $X_2$  是 Na。

I020331

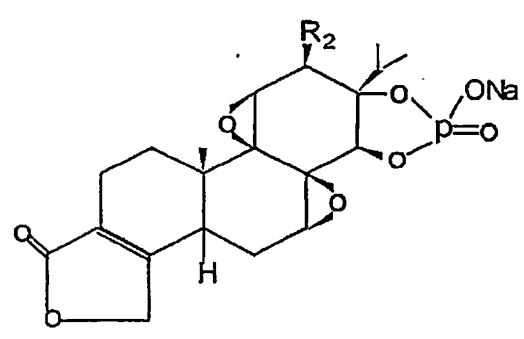
第 II 类雷公藤内酯醇衍生物是



结构式 II

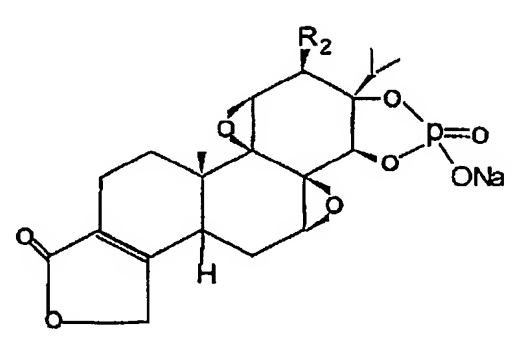
其中 R<sub>1</sub> 是 H, 含有 1—4 个碳原子的烷基, 或—AC, 或—C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>, (其中, n 为 1—4 的整数), 或磷酸酯 (  $-\text{P}(\text{O})(\text{Ox}_1)(\text{Ox}_2)$  ), 或亚磷酸酯 (  $-\text{P}(\text{H})(\text{Ox}_1)(\text{Ox}_2)$  ). X<sub>1</sub> 和 X<sub>2</sub> 是 Na, 或 K, 或 NH<sub>4</sub>. R<sub>2</sub> 是 H, 或—SCN 或—Cl(或—Br). 在本发明的第 II 类化合物中, 优选 R<sub>1</sub> 是磷酸酯 (  $-\text{P}(\text{O})(\text{Ox}_1)(\text{Ox}_2)$  ) 和丁二酸酐[—C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>], X<sub>1</sub> 和 X<sub>2</sub> 是 Na, R<sub>2</sub> 是—SCN.

第 III 类雷公藤内酯醇衍生物是



结构式 IIIa

或



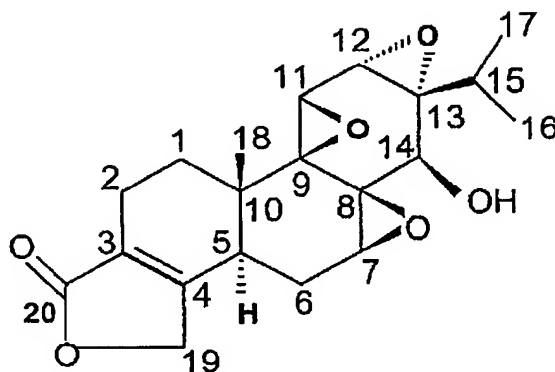
结构式 IIIb

其中 R<sub>2</sub> 是 H, 或—SCN, 或—Cl, 或—Br.

本发明的另一个目的是提供合成生产这些水溶性高的雷公藤内酯醇新衍生物的合成方法。具体来说从下述两种先导化合物制备上述三类水溶性雷公藤内酯醇衍生物的方法 (详细方法见实例 1—7)。



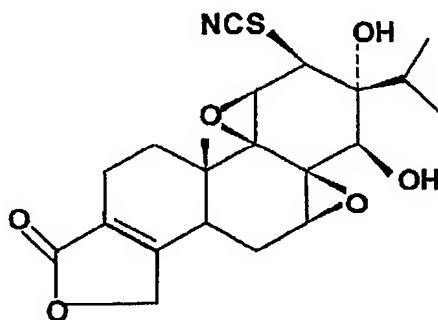
第一种先导化合物是雷公藤内酯醇:



雷公藤内酯醇(T)

美国专利(US Patent 5,962,516)描述了从雷公藤内酯醇制备 14-丁二酸酐雷公藤内酯醇及其钠盐的方法, 但本专利所发明的磷酸化制备的雷公藤内酯-14- $\beta$ -磷酸二钠具有更高的水溶性。

第二种先导化合物是 12- $\beta$ -硫氰酸基-13- $\alpha$ -羟基雷公藤内酯醇 (12- $\beta$ -thiocyano-13- $\alpha$ -hydroxy triptolide):



12- $\beta$ -硫氰酸基-13- $\alpha$ -羟基雷公藤内酯醇(T-SCN)

本发明的又一个目的是提供这些水溶性高的雷公藤内酯醇新衍生物免疫抑制活性的分子生物学证据(实施例 8,9)。证明了这些雷公藤内酯醇新衍生物显著抑制了细胞因子 IL-1, IL-2, IL-6, iNOS 的产生以及显著抑制了 Cox-2 的产生。

1020331

本发明的又一个目的是提供这些水溶性高的雷公藤内酯醇新衍生物低毒性的动物实验证据(实施例 10)。本发明由 T-SCN 而制备的水溶性雷公藤内酯醇衍生物的毒性显著降低, 例如 12- $\beta$ -硫氰酸基雷公藤内酯-13- $\beta$ -14- $\alpha$ -磷酸钠的 LD<sub>50</sub> 为 126 mg/kg 体重, 其毒性大大低于雷公藤内酯醇的 LD<sub>50</sub>(0.85mg/kg 体重), 而且其免疫抑制活性也相当高。

本发明的又一个目的是提供这些水溶性高的雷公藤内酯醇新衍生物治疗自动免疫缺陷疾病的动物实验证据。例如在对 DNC 引起小鼠迟发性超敏反应的影响实验(实施例 11)和大鼠棉球肉芽肿法抗炎试验(实施例 12)中 WDY 系列雷公藤内酯醇新衍生物均有显著的免疫抑制活性和抗炎活性。

10

#### 附图说明

图 1: 本发明的水溶性雷公藤内酯醇衍生物对 IL-2 的作用(medium: 空白对照, PHA: 脂多糖, CsA: 环孢菌素 A)。

图 2: 本发明的水溶性雷公藤内酯醇衍生物对 IL-1, IL-6, iNOS 的作用(medium: 空白对照, PHA: 脂多糖, CsA: 环孢菌素 A)。

图 3: 本发明的水溶性雷公藤内酯醇衍生物对 HT-29 细胞 PGE<sub>2</sub> 含量(pg/ml) 的影响 (对照 =22.93pg/ml, 消炎痛(indo)=1.3pg/ml, WDY 4=4.22pg/ml, WDY7=4.97pg/ml)。

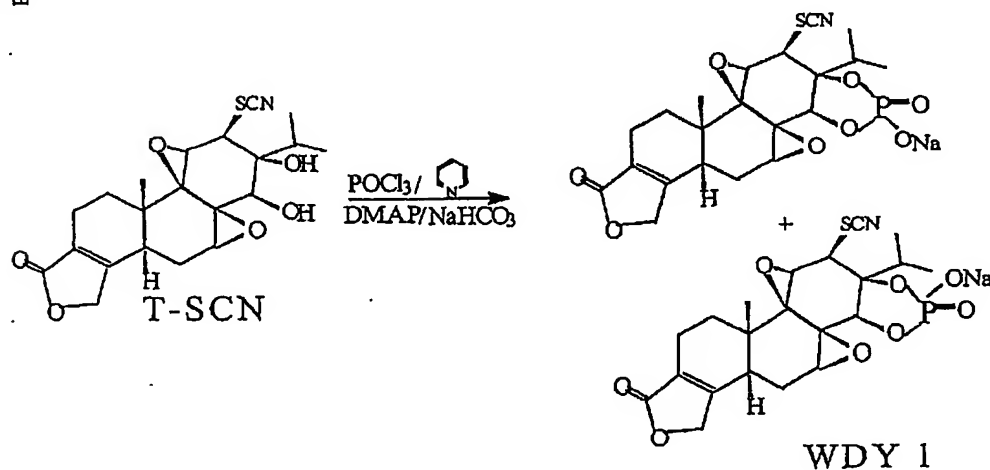
20

在以下的 12 个实施例中将对本发明作详细说明。

**实施例 1:** 12- $\beta$ -硫氰酸基雷公藤内酯-13- $\alpha$ -14- $\beta$ -磷酸钠(以下简称 WDY 1)的制备

25

30



I020331

在氮气保护下，三颈瓶中加 251mg T-SCN(0.600mmol),再加入 20ml 吡啶，加入 0.28mlPOCl<sub>3</sub> (3.000mmol)，最后加入 40mgDMAP，密封，室温反应 24 小时后，用冰浴冷却水解，调节 PH 到 8。减压浓缩至干，用乙腈溶解样品,除去无机盐。TLC 检测：正丁醇:水:冰醋酸 (10:1:1) 展开，主点为产物点 WDY1,含有极少量 T-SCN 和其它副产物。乙腈溶解，加入 2g 75~300 目硅胶拌样，除尽乙腈，75~300 目硅胶柱层析分离，正丁醇：水 (20:1) TLC 跟踪检测，收集产物点，合并，减压蒸除溶剂，加少量溶剂用乙醚沉淀，静置一小时后，过滤得到粉状固体，用干燥枪干燥，收率为 75%。水溶解度大于 100mg/ml。R<sub>f</sub> 值为 0.24，(正丁醇/水/冰醋酸 10:1:1)，显色剂为 Kedd's 试剂，呈紫红色。

MS ESI+ m/z:C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NSO<sub>8</sub>PNa 计算值：504.0858，测量值：504.0857。

MS ESI- m/z:C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NSO<sub>8</sub>P 计算值：480.0877，测量值：480.0888。

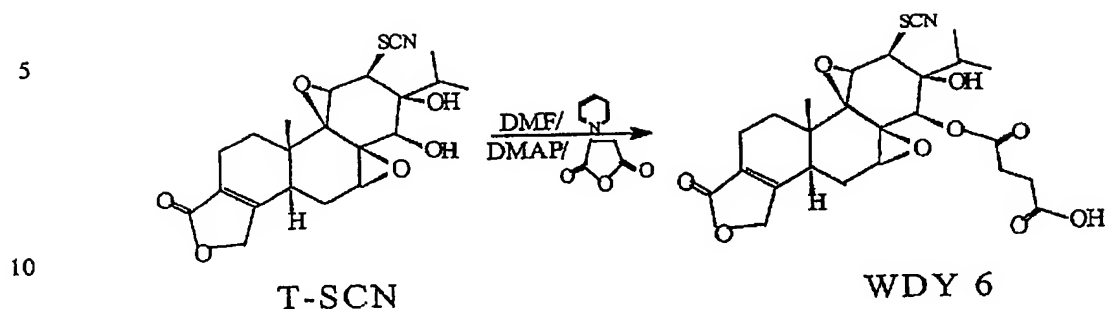
IR(KBr)cm<sup>-1</sup>: 3417, 2938, 2156, 1749, 1674, 1247, 1109, 1000

<sup>1</sup>HNMR,δppm: 0.84(3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.01(3H, d, J=6Hz,16-CH<sub>3</sub>), 1.04(3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 1.34(1H, m, 1-αH), 1.46(1H, m, 1-βH), 1.80(1m, t, J=14.4Hz,6-βH), 1.94(1H, m, 2-H), 2.13(1H, m, 2-H), 2.20(1H, m, 6-αH), 2.35(1H, m, 15-H), 3.09(1H, m, 5-H), 3.51(1H, br, 7-H), 3.71(1H, s, 12-H), 4.25(1H, br, 11-H), 4.61(1H, br,14-H), 4.85(2H, dd, J<sub>1</sub>=36Hz, J<sub>2</sub>=17.2Hz, 19-H);

<sup>13</sup>CNMR, δppm: 15.4(18-C), 17(2-C), 19.2(16-C), 20(17-C), 21.8(6-C), 29.5(1-C), 32.7(15-C), 35.0(10-C), 39(5-C), 55.7(11-C), 56.0,56.2(8-C), 56.7(7-C), 62.5(12-C), 66.0(9-C), 70.8(19-C), 77.5(14-C), 83.7(13-C), 112(SCN), 123(3-C), 163(4-C), 173.6(20-C)。

<sup>31</sup>PNMR, δppm:4.57.

实施例 2: 12-β-硫氰酸基-13-α-羟基雷公藤内酯-14-β-丁二酸单酯(以下简称 WDY 6) 的制备



室温下, 向 50ml 的三颈瓶中加入 80mg 12-β-硫氰酸基-13-α-14-β-羟基雷公藤内酯醇 (T-SCN) (0.191mmol), 8ml 吡啶, 加入 4ml DMF 和 24mg DMAP, 最后加入 3.2g 丁二酸酐 (3.820mmol), 密封搅拌反应一周后, 将反应液倒入冰水中, 用二氯甲烷抽提数次, 合并二氯甲烷, TLC 检查: 氯仿: 甲醇 (10:1), 主点为 WDY6 和极少量未反应的 12-β-硫氰酸基-13-α-14-β-羟基雷公藤内酯醇。减压浓缩, 蒸干溶剂, 用 H 硅胶, 氯仿: 甲醇 (14:1) 柱层析得纯品。收率为 90%。Rf: 0.30。熔点为 127-129°C。水溶解度大于 30mg/ml。

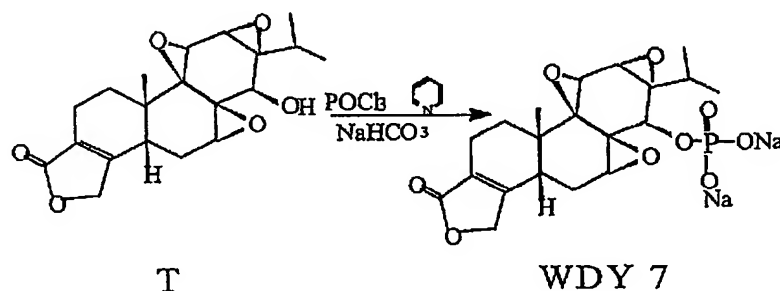
元素分析:  $C_{25}H_{29}SNO_9$ , 计算值%: C, 57.79。 H, 5.63。 N, 2.70。 实测值%: C, 57.66。 H, 5.91。 N, 3.05。

IR: 3435, 2970, 2152, 1745, 1673, 1157, 1022, 993。

25  $^1H$ NMR,  $\delta$ ppm: 0.79(3H, d,  $J=6.4$ Hz, 16- $CH_3$ ), 0.89(3H, s, 18- $CH_3$ ), 0.97(3H, d,  $J=6.4$ Hz, 17- $CH_3$ ), 1.29(1H, m, 1- $\alpha$ H), 1.44(1H, m, 1- $\beta$ H), 1.83(1m, t,  $J=14.4$ Hz, 6- $\beta$ H), 1.95(1H, m, 15-H), 1.99(1H, m, 2-H), 2.15(1H, m, 2-H), 2.23(1H, m, 6- $\alpha$ H), 2.46~2.51(4H,  $-CH_2CH_2-$ ), 2.69(1H, m, 5-H), 3.52(1H, d,  $^oJ=6.4$ Hz, 7-H), 3.96(1H, d,  $J=5.2$ Hz, 12-H), 4.03(1H, d,  $J=6.03$ Hz, 11-H), 4.53(1H, s, 14-H), 4.84(2H, dd,  $J_1=42$ Hz,  $J_2=18.4$ Hz 19-H); 5.53(1H, s, 13-OH), 12(1H, br,  $-COOH$ )。 30

$^{13}\text{C}$ NMR,  $\delta\text{ppm}$ : 14.3(18-C), 15.7(17-C), 16.3(16-C), 16.8(2-C), 22.2(6-C), 28.8~28.9(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 29.4(15-C), 30.1(1-C), 35.2(10-C), 39.5(5-C), 50.9(12-C), 57.7(11-C), 59.0(8-C), 62.1(7-C), 67.1(9-C), 70.6(19-C), 74.2(14-C), 75.6(13-C), 114.0(SCN), 123.5(3-C), 162.2(4-C), 170.8(-CO-), 173.38~173.43(-COOH, 20-C)。

### 实施例 3: 雷公藤内酯-14- $\beta$ -磷酸二钠(以下简称 WDY 7)的制法的制备



在氮气保护下, 三颈瓶中加入 180mgT(0.500mmol), 10ml 吡啶, 缓慢滴加 0.14ml POCl<sub>3</sub>(1.50mmol), 滴加完毕, 密封反应 2~3 小时, 冰浴冷却水解, 用碳酸氢钠调节 PH=9, 减压浓缩至干, 用甲醇溶解样品, 除去无机盐。TLC 检查: 正丁醇:水:冰醋酸 (4:1:1), 主点为 WDY7, 含有极少量 T 以及其它副产物。用正丁醇:水 (15:2) 硅胶柱层析。TLC 检查, 合并 WDY7, 减压浓缩至干, 用四氢呋喃溶解、乙醚沉淀得到纯品 167mg, 收率为(75%), R<sub>f</sub> 值为 0.32。水溶解度大于 100mg/ml。

MS:ESI+  $m/z$ : C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>PNa<sub>2</sub> 计算值:485.0956, 测定值:485.0953.

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3424, 2971, 2935, 2878, 1748, 1671, 1445, 1226, 1118, 1035, 975.

$^1\text{H}$ NMR:  $\delta\text{ppm}$ : 0.70 (3H, d, J=7.2Hz, 16-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, d, J=6.8Hz, 17-CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.25 (1H, m, 1- $\alpha$ H), 1.30 (1H, m, 1- $\beta$ H),

I020331

1.82 (1H, t,  $J=13.8\text{Hz}$ , 6- $\beta\text{H}$ ), 1.96 (1H, m, 2-H), 2.08 (1H, m, 2-H), 2.13 (1H, m, 6- $\alpha\text{H}$ ), 2.21 (1H, m, 15-H), 2.55 (1H, m, 5-H), 3.36 (1H, m, 7-H), 3.83 (1H, m, 11-H), 4.11 (1H, d,  $J=11.6\text{Hz}$ , 14-H), 4.83 (2H, dd,  $J_1=35.0\text{Hz}$ ,  $J_2=17.4\text{Hz}$ , 19-H)。

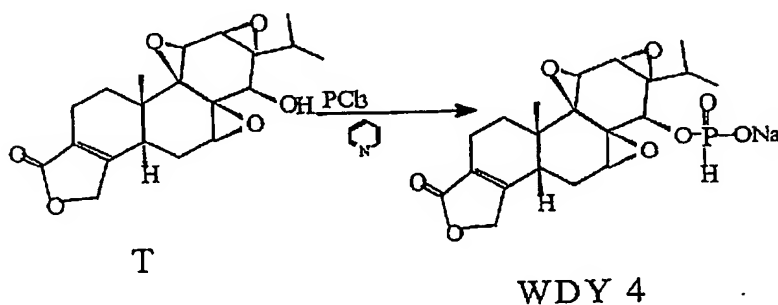
5

$^{13}\text{CNMR}$ ,  $\delta\text{ppm}$ : 14.4 (18-C), 17.1 (2-C), 17.5 (16-C), 18.0 (17-C), 23.1 (6-C), 26.0 (15-C), 29.7 (1-C), 35.7 (10-C), 40.3 (5-C), 54.7 (12-C), 55.5 (11-C), 60.8 (7-C), 71.0 (19-C), 75 (14-C), 123.8 (3-C), 163.2 (4-C), 174.1 (20-C), 61.1, 64.2, 65.2, 65.3 (8-C, 9-C, 13-C)。

10

实施例 4: 雷公藤内酯-14- $\beta$ -亚磷酸钠(以下简称 WDY 4)的制法的制备

15



20

在氮气保护下, 25ml 的三颈瓶中加入 200mg T (0.556mmol) 和 20ml 吡啶后, 缓慢滴加 0.10ml  $\text{POCl}_3$  (1.149mmol), 待加料完毕, 停止通入氮气, 密封反应 1 小时后, 将反应瓶用冰水浴冷却, 向反应液中缓慢加入饱和碳酸氢钠溶液水解, 并将 PH 值调节至 8。将溶剂减压蒸干后, 加入氯仿/甲醇 (5/2) 溶解, 除去无机盐。TLC 检查: 正丁醇:水:冰醋酸 (4:1:1), WDY4 为主要点, 含少量其它副产物。用 H 硅胶 22 克, 氯仿:甲醇 (5:2) 柱层析。TLC 检查, 合并产物, 减压蒸除溶剂, 再少量洗脱液溶解后, 乙醚沉淀得到纯品 70mg, 收率 50%,  $R_f$  值为 0.46, 显色剂为 Kedd's 试剂, 呈紫红色。

30 水溶解度大于 100mg/ml。

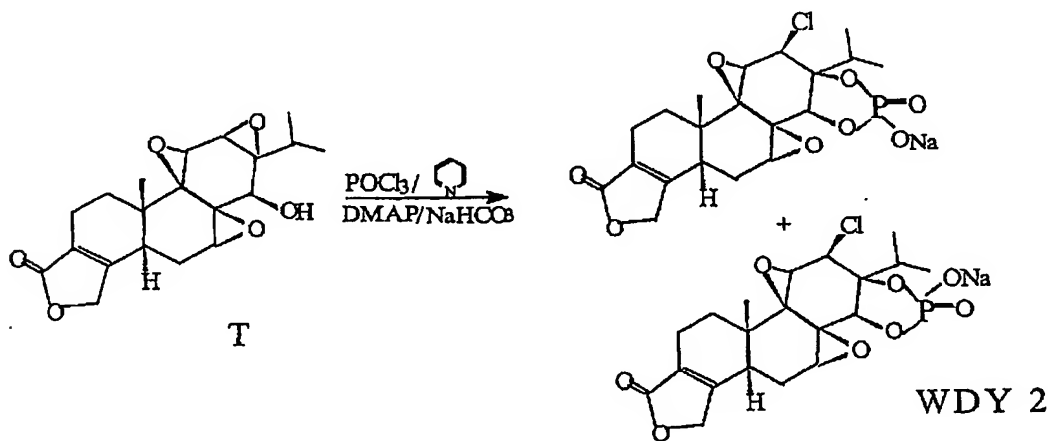
IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3424, 2965, 2365, 1750, 1627, 1226, 1028, 972。

<sup>1</sup>H NMR, δ ppm: 0.74 (3H, d, J=7.2Hz, 16-CH<sub>3</sub>), 0.90 (3H, d, J=6.8Hz, 17-CH<sub>3</sub>), 0.94 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.25 (1H, m, 1-αH), 1.32 (1H, m, 1-βH), 1.80 (1H, t, J=14.2Hz, 6-βH), 1.94 (1H, m, 2-H), 2.10 (1H, m, 2-H), 2.20 (1H, m, 6-αH), 2.33 (1H, m, 15-H), 2.59 (1H, m, 5-H), 3.29 (1H, m, 7-H), 3.52 (1H, d, J=3.2Hz, 11-H), 3.82 (1H, d, J=3.2Hz, 12-H), 4.03 (1H, d, J=12.4Hz, 14-H), 4.83 (2H, m, 19-H), 6.7 (1H, d, J=595.6Hz, P-H)。

<sup>13</sup>C NMR, δ ppm: 13.9 (18-C), 16.7 (2-C), 17.0 (16-C), 17.5 (17-C), 22.8 (6-C), 26.3 (15-C), 29.2 (1-C), 35.3 (10-C), 40.1 (5-C), 54.3 (12-C), 54.9 (11-C), 60.4 (7-C), 70.3 (19-C), 73. (C-14, d, J=22.8Hz), 123.2 (3-C), 162.5 (4-C), 173.2 (20-C), 63.5, 64.5, 64.6 (8-C, 9-C, 13-C)。

<sup>31</sup>P NMR, δ ppm: 1.34 (d, J<sub>P-H</sub>=599Hz)。

实施例 5: 12-β-氯雷公藤内酯-13-α-14-β-磷酸钠(以下简称 WDY 2)的制备



在氮气保护下, 三颈瓶中加入 108mg T (0.3mmol), 30ml 吡啶和 39mg DMAP 后, 滴加 1.5ml POCl<sub>3</sub> (16.37mmol), 待加料完毕, 停止通入氮气, 密封室温反应 24 小时, 冰浴冷却水解, 用饱和碳酸氢钠调节 PH=8, 减压浓缩至干, 用四氢呋喃溶解样品, 除去无机盐。TLC 检查: 正丁醇: 水: 冰醋酸 (10:1:1), 主点为 WDY2, 含有极少量 T 和其它副产物。所得样品用硅胶正丁

1020331

醇:水(15:2)柱层析。TLC检查,合并WDY 2,浓缩蒸干,用少量四氢呋喃溶解、乙醚沉淀得到纯品 115.2mg,收率 80%, $R_f$ 值为 0.33,显色剂为 Kedd's 试剂,呈紫红色。水溶解度大于 100mg/ml。

5 元素分析:  $C_{20}H_{23}O_7ClPNa$  计算值%: C 49.96, H 4.82, 实测值%: C 49.75, H 4.43。

IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3428, 2930, 1741, 1634, 1244, 1023, 582

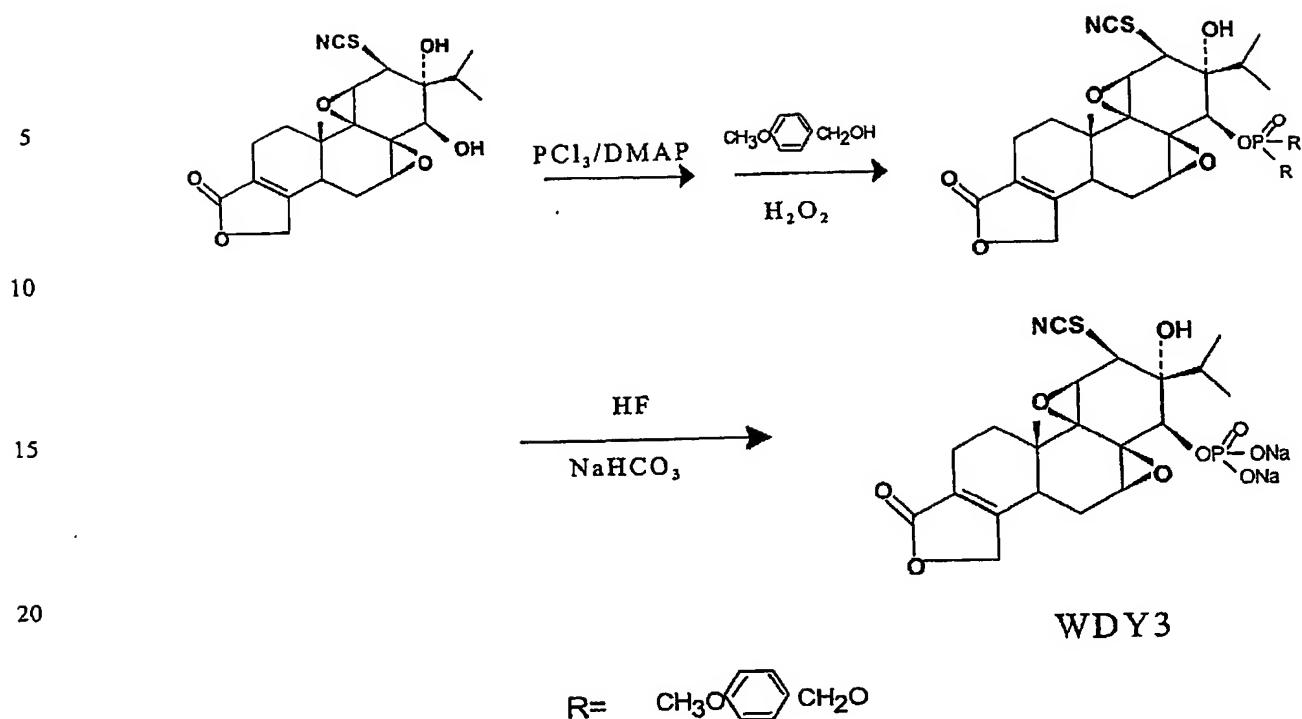
10  $^1H$ NMR,  $\delta$ ppm: 0.78 (3H, d,  $J=6.8Hz$ , 16- $CH_3$ ), 0.96 (3H, d,  $J=6.8Hz$ , 17- $CH_3$ ), 1.0 (3H, s, 18- $CH_3$ ), 1.36 (1H, m, 1- $\alpha$ H), 1.38 (1H, m, 1- $\beta$ H), 1.89 (1H, m, 6- $\beta$ H), 2.06 (1H, m, 2-H), 2.16 (1H, m, 15-H), 2.21 (1H, m, 2-H), 2.39 (1H, m, 6- $\alpha$ H), 3.05 (1H, d,  $J=12.8Hz$ , 5-H), 3.54 (1H, d,  $J=2.4Hz$ , 12-H), 3.86 (1H, d,  $J=2.8Hz$ , 11-H), 4.44 (1H, s, 14-H), 4.63 (1H, s, 7-H), 4.83 (2H, m, 19-H)。

15  $^{13}C$ NMR,  $\delta$ ppm: 15.0 (18-C), 16.8 (16-C), 17.6 (2-C), 18.0 (17-C), 28.5 (6-C), 28.9 (15-C), 29.9 (1-C), 37.0 (10-C), 37.5 (5-C), 53.4 (12-C), 57.8 (11-C), 63.7 (7-C), 70.7 (19-C), 74.6 (14-C), 124.0 (3-C), 163.3 (4-C), 173.5 (20-C), 61.8, 61.9, 62.9, 81.4 (8-C, 9-C, 13-C)。

$^{31}P$ NMR,  $\delta$ ppm: 2.96。

25 实施例 6: 12- $\beta$ -硫氰酸基-13- $\alpha$ -羟基雷公藤内酯-14- $\beta$ -磷酸二钠(以下简称 WDY3)的制备





25

30

35

在氮气保护下，三颈瓶中加 41.9mg T-SCN (0.100mmol)，再加入 5ml 吡啶，加入 8mg DMAP，最后加入 0.018ml  $\text{PCl}_3$  (0.200mmol)，密封，室温反应，加入 0.065ml 对甲氧基苄醇 (0.520mmol)，室温反应十分钟后，加入 0.200ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温反应半小时后，用冰浴冷却并加入饱和  $\text{NaHCO}_3$  水解。减压浓缩至干，用乙酸乙酯溶解样品，除去无机盐，用饱和氯化钠水溶液洗涤数次，并用无水硫酸钠干燥后，减压浓缩至干，用乙腈溶解转移到塑料试管中，再加入 0.300ml  $\text{HF}$  (48%) 反应 72 小时，TLC 检测：正丁醇:水:冰醋酸 (4:1:1) 展开，主点为产物点，含有极少量 T-SCN 和其它副产物。乙腈溶解加入 2g 75~300 目硅胶拌样，除尽乙腈，75~300 目硅胶柱层析分离，正丁醇:水 (15:2)，TLC 跟踪检测，收集产物点，合并，减压蒸除溶剂，加少量溶剂用乙醚沉淀，静置一小时后，过滤得到粉状固体，用干燥枪干燥， $R_f$  值为 0.24，(正丁醇/水/冰醋酸 4:1:1)，显色剂为 Kedd's 试剂，呈紫红色。产物水溶解度大于 100mg/ml。

40

1020331

实施例 7: 12-β-硫氰酸基雷公藤内酯-13-α-羟基-14-β-亚磷酸钠和 12-β-硫  
 氰酸基 雷公藤内酯-14-β-羟基-13-α-亚磷酸钠(以下简称 *WDY5*)

5

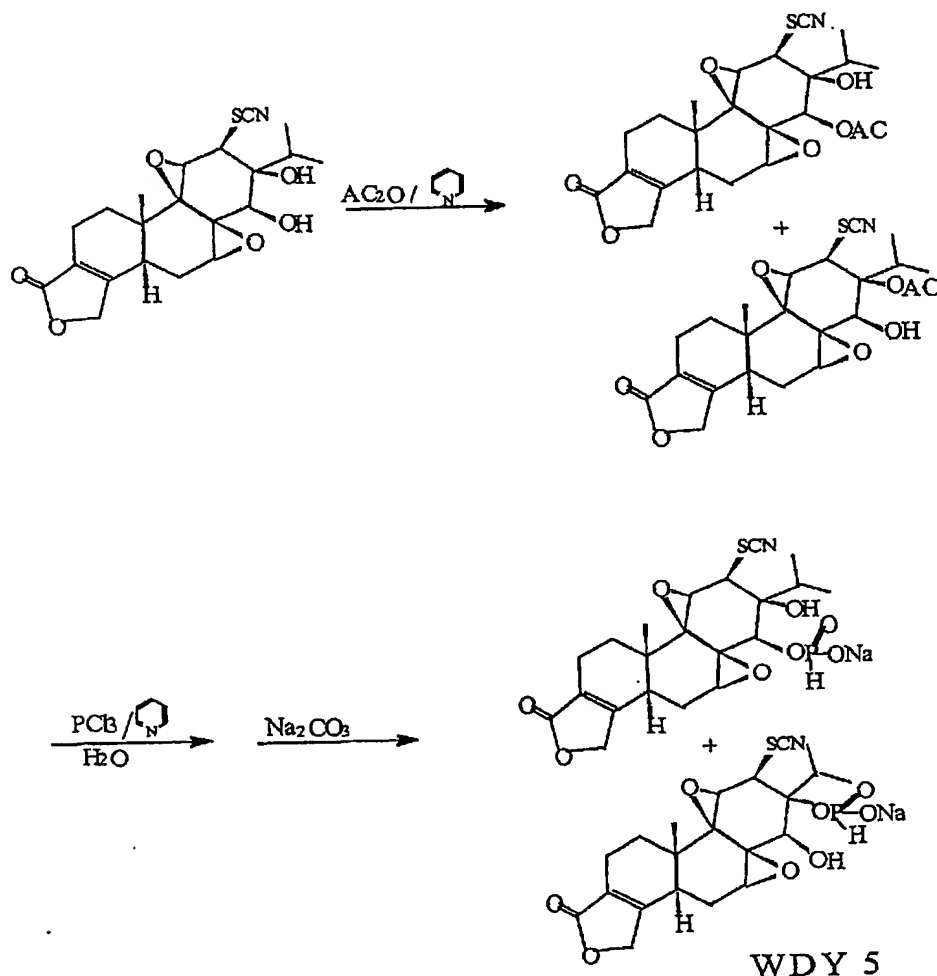
10

15

20

25

30



在三颈瓶中加 80mg T-SCN (0.191mmol)，再加入 8ml 吡啶，搅拌溶  
 35 解，再加入 8ml 醋酐，在室温下密封反应一周，然后于 40°C 反应 10 小时  
 后，将反应液倒入冰水中，用二氯甲烷萃取三次并合并二氯甲烷，用饱和  
 NaHCO<sub>3</sub> 三次，再用饱和 NaCl 水溶液洗涤至中性，最后用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥  
 24 小时，减压蒸馏浓缩除去溶剂得粗品 TLC 检查，氯仿:甲醇 (10:1)，乙  
 酰化 T-SCN 为主点,含少量 T-SCN. 丙酮溶解，加入 0.5 克硅胶拌样，硅胶柱  
 40 层析，氯仿:甲醇(15:1)洗脱，TLC 检查，收集乙酰化 T-SCN 馏分，得 70mg。  
 在氮气保护的三颈瓶中，将 70mg 乙酰化 T-SCN 溶于 2ml 吡啶中，再加入  
 0.1ml PCl<sub>3</sub>，在室温下密封反应 30 分钟 后，冰水冷却，水解，并加入 40ml 二

1020331

氯甲烷,用水洗两次、合并水相的 60ml, TLC 检查, 正丁醇:水:冰醋酸 (4:1:1), 基本无杂质。向上述 60ml 水溶液中加入 40ml 饱和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液, 室温下水解 18 小时, 用稀  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中和使  $\text{PH}=7$ , 减压蒸馏除水, 乙醇除盐, TLC 检查, 正丁醇:水:冰醋酸 (10:1:1), 产物点明显, 但有较多杂质点。用氯仿: 甲醇 (4:1), 硅胶柱层析得 WDY5。  $R_f$  值为 0.54。产物水溶解度大于 100mg/ml。

### 实施例 8: WDY 系列化合物对细胞因子 IL-1, IL-2、IL-6 以及 iNOS 的作用

细胞因子, 前列腺素类以及一氧化氮均为免疫系统的重要介质, 且表达在许多与自动免疫缺陷症和炎症疾病相关的组织和细胞中。为了研究药物对这些炎症介质生成的抑制作用, 应用实时逆转录多聚酶链反应定量检测了 IL-1, IL-2, IL-6 以及 iNOS mRNA 表达水平, 这些炎症因子是由 LPS 或 PHA 刺激大鼠脾脏淋巴细胞而诱导产生。环孢菌素 A 和 WDY4 完全抑制了 LPS 或 PHA 诱导的 IL-2 mRNA 表达(图 1), WDY-4 也完全抑制 IL-6 和 iNOS 的 mRNA 表达 (图 2)。而环孢菌素 A 对这两种因子的作用较弱。WDY1 和 WDY6 的免疫抑制活性也很好, 动物试验结果显示这两种化合物的毒性很低。提示本发明及其衍生物在治疗自动免疫缺陷症和炎症疾病的有效作用。

### 实验方法

按照标准方法从 Lewiz 大鼠中获得脾细胞, 并将其接种于 6 孔培养板内, 细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。向培养细胞内加入适当浓度的化合物, 在  $37^\circ\text{C}$  预培养 15 分钟再加入  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS(Sigma 产品)或  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  PHA (Sigma 产品), 在  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  条件下培养 2 小时, 用 Qiagen 公司的 RNA 制备试剂盒提取脾细胞总 RNA。

按照厂商(Perkin Elmer applied Biosystems)提供的 ABI TaqMan 检测试剂盒说明进行 RT-PCR 实验, 在包含 2mM 脱氧核苷酸混合物, 100mM DTT, 40 单位 RNase 抑制剂, 50ng 随机引物, 15 单位 Thermoscript 逆转录酶的反应体系中将脾细胞 mRNA( $1\mu\text{g}$ )逆转录为互补 DNA(cDNA), 反应条件

I020331

为 25℃, 10 分钟, 48℃, 45 分钟, 90℃, 5 分钟, 然后冷却至 4℃。用 TaqMan PCR 技术在 ABI 7700 序列检测器上测定了 IL-1、IL-2、IL-6、iNOS 和亲环素的表达水平, 反应体系包括 1×TaqMan Universal Master Mix, 900nM 正向(上游)和反向(下游)引物, 200nM TaqMan 探针, 加入 50nM 引物和探针, 热循环条件为 95℃, 15 分钟, 60℃, 1 分钟, 共进行 40 个循环。用相关标准曲线计算目的 mRNA 和亲环素的 mRNA 表达产量。结果见图 1 和图 2。

### 实施例 9: 用 PGE<sub>2</sub> 酶活性法检测本发明对 COX-2 的抑制作用

用 Cayman 公司 PGE<sub>2</sub> EIA 试剂盒检测了本发明对 COX-2 催化花生四烯酸生 PGE<sub>2</sub> 的影响。将适当密度的 HT-29 人结肠癌细胞接种在含 10% 小牛血清和适量青、链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 待次日细胞贴壁后换用新的培养液并加入本发明 (WDY4 和 WDY7, 10ug/ml), 以消炎痛 (100ug/ml) 作为阳性对照, 不加药物为阴性对照。药物作用 24 小时后, 弃去旧培养液, 并用 PBS 洗涤两次, 加入 1ml 包含 40μM 花生四烯酸(AA)的无血清培养基, 37℃作用 30 分钟, 收集上清, 按试剂盒操作说明进行衍生化过夜, 并检测和计算 PGE<sub>2</sub> 的生成量, 结果见附图 3。

### 实施例 10: WDY 1 静脉注射 LD<sub>50</sub> 结果

WDY 1 用水配制, 设 5 个剂量组(150, 135, 122, 109, 98 mg/kg 体重), 每组 10 只昆明种小鼠 (动物合格证号: 川实动管第 99-30 号), 雌雄各半, 尾静脉注射 (iv), 确定 WDY 1 的急毒 LD<sub>50</sub> 为 126 mg/kg 体重。

I020331

剂量 (mg/kg)	Log (D)	小鼠数	小鼠死亡 数	小鼠死亡 率	LD <sub>50</sub>	95% limit
150	2.1761	10	9	90	126	119-133
135	2.1303	10	8	80		
122	2.0864	10	4	40		
109	2.0374	10	1	10		
98	1.9912	10	0	0		
Y=-38.1841 +20.56654 log (D) (G=0.2063235)						

### 实施例 11: WDY 对 DNC 引起小鼠迟发性超敏反应的影响

原理: 二硝基氟苯(dinitrofluorobenzene,DNEB)为半抗原, 将其溶液涂  
抹于腹壁皮肤后, 与皮肤蛋白结合成全抗原, 由此刺激 TLC 增殖成致敏淋巴  
细胞。4-7 天后将其再次涂抹于皮肤, 可使局部产生迟发型变态反应(水肿),  
一般在抗原攻击后 24-48 小时达高峰, 故于此时测定局部肿胀。

评定: 检测药物对细胞免疫的作用外, 还常被采用制备细胞免疫功能增高  
和低下模型。迟发型超敏反应是致敏机体在抗原攻击 24-48 小时后发生的组  
织损伤。高峰期测定组织肿胀度可代表迟发型超敏反应强度。

#### 1. 试验材料

试药: WDY1、WDY6、WDY7 均系类白色粉末, 临用前用生理盐水配成所需  
浓度。

动物: 昆明种小鼠 110 只, 动物合格证号: 川实动管第 99-30 号。

试剂: 2,4 二硝基氯苯(DNCB), 批号: 20000101, 由上海试剂一厂生  
产。临用前用丙酮配成 50%、2%、0.5%和 0.15%几种浓度。

2. 试验方法: 根据中国卫生部颁发新药(西药)临床前研究指导原  
则的抗炎免疫药物药效学指导原则设计。

剂量设置: 按下表 1 进行分组和给药:

表 1

组别	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/ml)	给药量×次数 (ml/10g×次)	给药 方式
模型组	NS	-	0.1×10	ip.
WDY1 低	2.4	0.24	0.1×10	ip.
WDY1 中	6	0.6	0.1×10	ip.
WDY1 高	15	1.5	0.1×10	ip.
WDY6 低	3.2	0.32	0.1×10	ip.
WDY6 中	8	0.8	0.1×10	ip.
WDY6 高	20	2	0.1×10	ip.
WDY7 低	0.05	0.005	0.1×5	ip.
WDY7 中	0.14	0.014	0.1×5	ip.
WDY7 高	0.4	0.04	0.1×5	ip.
环孢菌素-A	100	10	0.1×10	po.

致敏：每只小鼠背部脱毛一小块，用微量注射器将 50% 的 DNCB 丙酮溶液 2  $\mu$ l 滴于裸露的皮肤上，致敏动物。

给药：致敏当日即按上表开始给药，每天一次，连续十天（其中 WDY7 是隔日给药）。

激发：给药后第十天，每只小鼠腹部脱毛三处，大小约为  $d=1\text{cm}$ ，分别用 2%、0.5%、0.15% 的 DNCB 丙酮溶液各 20  $\mu$ l 滴于裸露的三处皮肤上，激发动物。

评价指标：于激发后 24h、48h、72h 观察动物三处皮肤的反应，按下表进行计分，取三处皮肤计分之和作为评价指标，与对照组比较。

附表 2：皮肤反应强度的判断标准

级别（计分）	皮肤反应
0	完全无反应
0.5	稍有颜色改变或皮疹
1.0	颜色改变明显（黄或红色），但无隆起或水肿
2.0	颜色改变明显（黄或红色），且有隆起或水肿
3.0	红肿且稍有坏死
4.0	坏死，结痂

### 3. 试验结果

表 3

组 别	激发后时间		
	24h	48h	72h
模型组	2.4±0.84	3.30±0.71	3.30±1.3
阳性对照 (环孢素 A)	0.6±0.21**	0.85±0.34**	1.55±0.50**
WDY1 低	0.55±0.37**	0.90±0.51**	1.25±0.75**
WDY1 中	0.80±0.79**	1.15±1.11**	1.50±0.97**
WDY1 高	0.30±0.26**	0.70±0.26**	0.85±0.24**
WDY6 低	0.45±0.37**	0.40±0.32**	0.55±0.37**
WDY6 中	0.50±0.58**	0.85±0.47**	0.83±0.25**
WDY6 高	0.25±0.26	0.55±0.37**	0.55±0.28**
WDY7 低	0.40±0.21**	0.40±0.21**	0.75±0.26**
WDY7 中	0.20±0.26**	0.41±0.21**	0.65±0.34**
WDY7 高	0.0±0.0**	0.17±0.29**	0.17±0.29**

### 5 实施例 12: WDY<sub>1</sub>、WDY<sub>6</sub>、WDY<sub>7</sub>抗炎试验(棉球肉芽肿法)

原理: 棉球植入大鼠体内引起结缔组织增生, 这种肉芽增生与临床上某些炎症后期病理改变相似, 用于评定药物抗结缔组织增殖作用。比较用药组与阴性对照组肉芽肿重量的差异, 各用药组抑制率, 经比较有显著性差异, 则认为该药对该炎症模型有抗炎作用。阳性药为氢化可的松。

#### 10 1. 实验材料

动物: Wister 大鼠 110 只, 雄性, 体重 200-250g。试药: WDY<sub>1</sub>、WDY<sub>6</sub>、WDY<sub>7</sub>。阳性样品: 氢化可的松。

2. 实验方法: 根据中国卫生部颁发新药(西药)临床前研究指导原则的抗炎免疫药物药效学指导原则设计。

15 110 只动物在戊巴妥钠 ip30mg/kg 麻醉下, 右腹下植入消毒干棉球 20mg, 第二天按表 1 分组给药, 末次给药后 24 小时, 处死大鼠, 剥离棉球, 剃除脂肪组织, 放入 60℃ 烤箱中烘烤 1 小时, 取出棉球称重, 将称得的重量减去原棉球重量 20mg, 作为肿胀程度并以 mg/100g 体重表示, 同时用药组与对照组进行比较。

#### 20 3. 实验结果

Best Available Copy

1020331

表 4 WDY<sub>1</sub>、WDY<sub>6</sub>、WDY<sub>7</sub> 抗炎试验 (棉球肉芽肿法) 结果

剂量次数	组别	给药途径	鼠数 (只)	平均肉芽肿 ( $\bar{X} \pm SD$ , 折成 mg/100g)	肿胀抑制率 (%)
--	对照组	iv	9	68.0 $\pm$ 39.9	
40mg/kg $\times$ 8	氢化可的松	Po	9	39.3 $\pm$ 22.2	42.2
2.5mg/kg $\times$ 8	WDY	iv	8	36.5 $\pm$ 11.2	46.3
5mg/kg $\times$ 8	WDY <sub>1</sub>	iv	9	36.9 $\pm$ 9.9	45.7
10mg/kg $\times$ 8	WDY <sub>1</sub>	iv	9	27.7 $\pm$ 6.2	59.3
2.5mg/kg $\times$ 8	WDY <sub>6</sub>	iv	8	39.0 $\pm$ 18.2	42.6
5mg/kg $\times$ 8	WDY <sub>6</sub>	iv	9	36.0 $\pm$ 11.8	47.1
10mg/kg $\times$ 8	WDY <sub>6</sub>	iv	8	34.7 $\pm$ 10.2	49.0
0.025mg/kg	WDY <sub>7</sub>	iv(隔)	8	39.8 $\pm$ 9.5	41.5
0.06mg/kg $\times$	WDY <sub>7</sub>	iv(隔)	8	30.2 $\pm$ 4.6	55.6
0.125mg/kg	WDY <sub>7</sub>	iv(隔)	9	29.4 $\pm$ 6.1	56.8

如表 4 所示氢化可的松组与对照组比较,其棉球肉芽肿重量明显小于对照组。WDY<sub>1</sub>、WDY<sub>6</sub>、及 WDY<sub>7</sub> 均有明显抗棉球肉芽肿的作用。三样品高中剂量及 WDY<sub>1</sub> 低剂量其棉球芽肿与对照组比较均显著的减小, 且有一定的正量效关系。



# 说明书附图

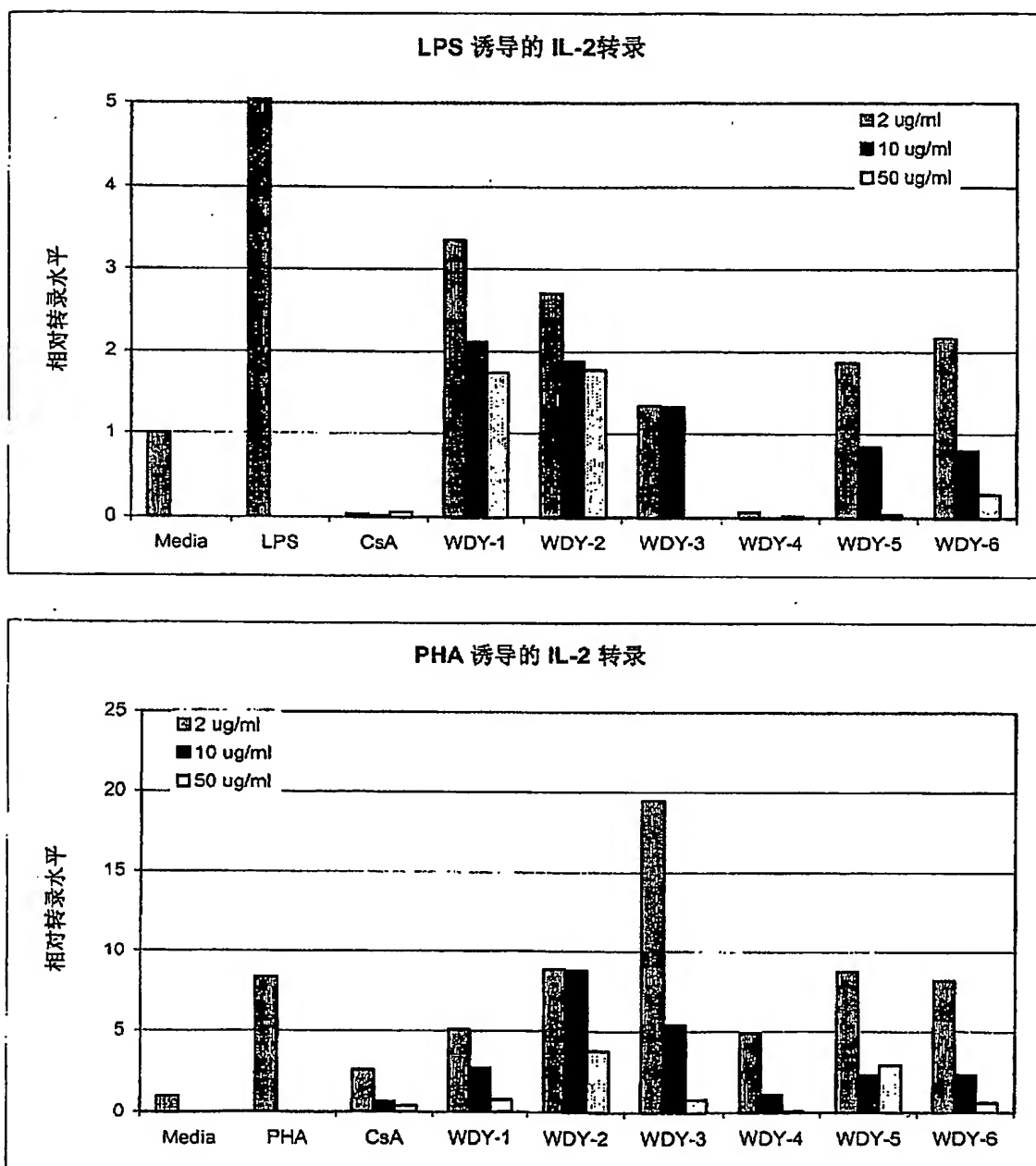


图 1

Best Available Copy

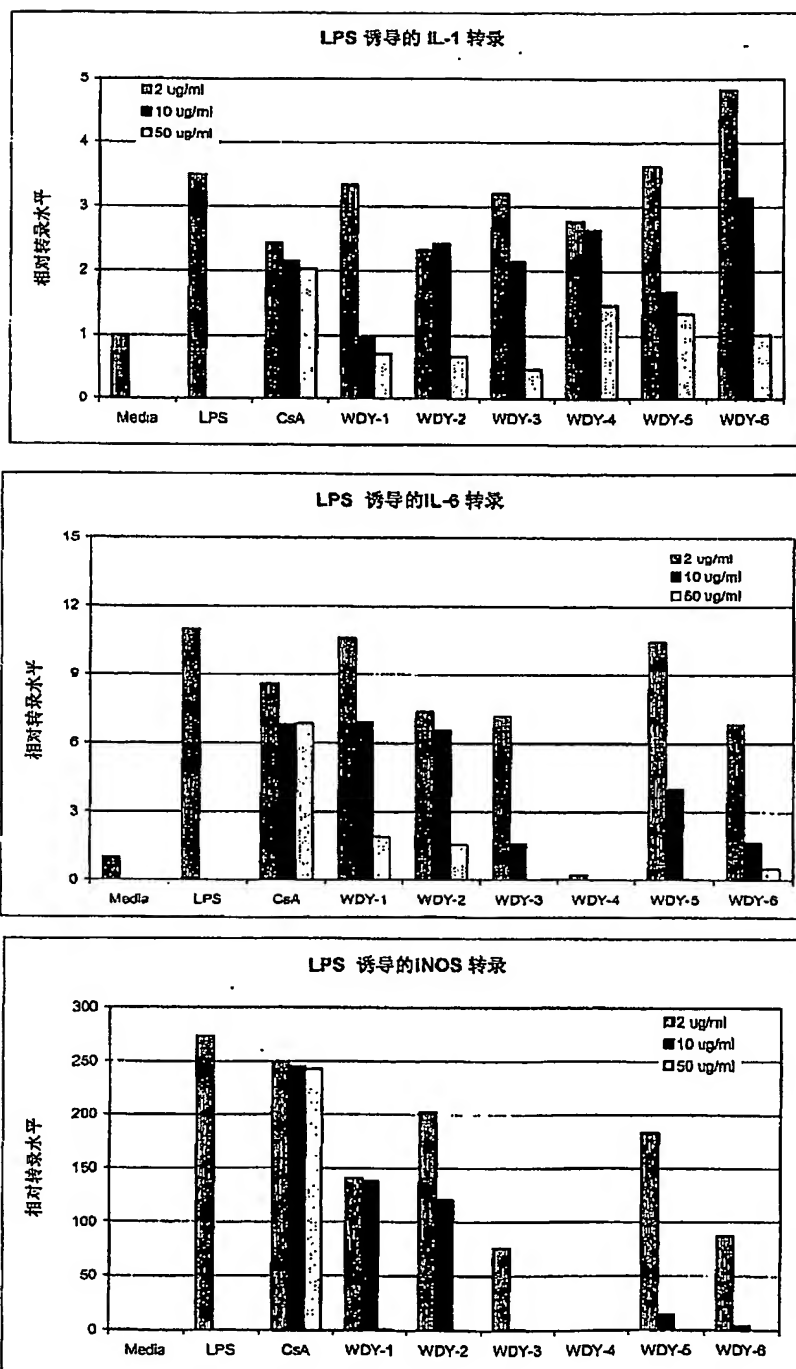


图 2

Best Available Copy

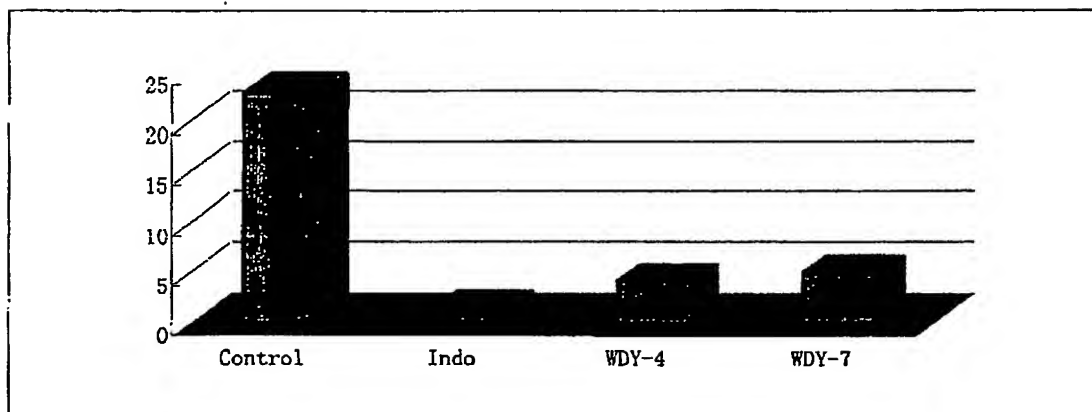


图 3

Best Available Copy